Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale" n. 261 del 22 settembre 1979

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I

GAZZETTA UFFICIALE

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA ROMA - Sabato, 22 settembre 1979 SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI MENO I FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DI GRAZIA E GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE DELLE LEGGI E DECRETI - CENTRALINO 65101
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI, 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 8508

DECRETO MINISTERIALE 30 luglio 1979.

Approvazione di metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali - Supplemento n. 5.

LEGGI E DECRETI

DECRETO MINISTERIALE 30 luglio 1979.

Approvazione di metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali - Supplemento n. 5.

IL MINISTRO
DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE
DI CONCERTO CON
I MINISTRI DELLE FINANZE, DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO E DELLA SANITÀ

Visto l'art. 33 del regio decreto 31 dicembre 1925, n. 2594, contenente norme per il funzionamento delle stazioni di prove agrarie e speciali, col quale si stabilisce che le stesse stazioni debbono seguire metodi di analisi determinati da questo Ministero;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 23 novembre 1967, n. 1318, contenente norme per il riordino della sperimentazione agraria;

Visto l'art. 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, riguardante la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari e l'art. 108 del regolamento per la esecuzione dello stesso regio decreto-legge, approvato con regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nel regio decreto-legge e nel regolamento suddetti dovranno essere eseguite, dai laboratori incaricati, con i metodi prescritti da questo Ministero, di concerto con quelli delle finanze e della sanità;

Visto il decreto ministeriale 9 novembre 1971, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 308 del 6 dicembre 1971, con il quale sono stati approvati i « Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico »;

Vista l'VIII direttiva della commissione C.E.E. del 15 giugno 1978 (78/633/CEE) pubblicata nella « Gazzetta Ufficiale » delle Comunità europee n. L 206 del 29 luglio 1978, con la quale vengono fissati i metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali;

Ritenuto necessario adottare le opportune disposizioni per conformare le norme nazionali a quelle della predetta direttiva comunitaria;

Sentito il parere della commissione per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi — sottocommissione alimenti per il bestiame — relativi ai prodotti agrari e sostanze di uso agrario di cui al decreto ministeriale 23 settembre 1978, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 23 del 24 gennaio 1979;

Decreta:

Art. 1.

Sono approvati i « Metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali » descritti nel supplemento n. 5, allegato al presente decreto.

Art. 2.

Le disposizioni generali di cui alla prima parte (introduzione) del supplemento n. 2 ai metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico, approvato con decreto ministeriale 18 luglio 1975, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 214 del 12 agosto 1975, eccetto la parte relativa alla « preparazione del campione da analizzare », si applicano ai metodi descritti nel supplemento n. 5 allegato al presente decreto.

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 30 luglio 1979

Il Ministro dell'agricoltura e delle foreste
MARCORA

Il Ministro delle finanze
MALFATTI

Il Ministro dell'industria, del commercio e dell'artigianato
NICOLAZZI

Il Ministro della sanità
ANSELMI

METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEGLI ALIMENTI PER ANIMALI

SUPPLEMENTO N. 5

1) Dosaggio della zinco-bacitracina.

2) Dosaggio del flavofosfolipol.

3) Determinazione degli oligo elementi ferro, rame, manganese e zinco.

1. — DOSAGGIO DELLA ZINCO-BACITRACINA
— per diffusione in agar —

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Il presente metodo permette di dosare la zinco-bacitracina nei mangimi, nei concentrati e nelle premiscele. Il limite inferiore di dosaggio è di 5 mg/kg (5 ppm) (*). Il metodo non è valido in presenza di sostanze interferenti, in particolare di forti quantità di rame o di acido ascorbico.

2. PRINCIPIO.

Il campione viene estratto a pH2 con una miscela metanolo/acqua/acido cloridrico. L'estratto ottenuto viene portato a pH 6,5, concentrato o diluito se necessario. La sua attività antibiotica è determinata misurando la diffusione della zinco-bacitracina su terreno agarizzato, insemenzato con il *Micrococcus luteus* (*sinonimo: M. flavus*). La diffusione è rivelata dalla formazione di aloni di inibizione del microrganismo. Si ammette che il diametro di tali aloni sia direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione di antibiotico.

3. MICRORGANISMO: MICROCOCCUS LUTEUS ATCC 10240.

3.1. *Conservazione del ceppo.*

Insemenzare con il *Micrococcus luteus* il terreno colturale (4.1), distribuito in provette a becco di clarino. Incubare per 24 ore a 30-37°C, conservare a + 4°C circa e trapiantare ogni due settimane.

(*) 1 mg di zinco-bacitracina (qualità per alimenti animali) equivale a 42 unità internazionali (UI).

3.2. *Preparazione della sospensione batterica* (*a*).

Mediante 2-3 ml della soluzione di cloruro di sodio (4.3.), raccogliere la patina di una agar-coltura (3.1.), preparato di recente. Con tale sospensione, insemenzare in superficie una bottiglia di Roux contenente 250 ml del terreno colturale (4.1.); incubare per 18-20 ore a 30-37°C. Raccogliere la patina con 25 ml di soluzione di cloruro di sodio (4.3.) e omogenizzare. Diluire la sospensione 1 : 10 con la soluzione di cloruro di sodio (4.3.). La trasmittanza della sospensione, misurata a 650 nm sotto lo spessore di 1 cm, dev'essere del 75% circa rispetto a quella della soluzione di cloruro di sodio (4.3.).

4. Terreni colturali e reattivi.

4.1. *Terreno di mantenimento del ceppo* (*b*).

Peptone di carne	6,0 g
Triptone	4,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Estratto di carne	1,5 g
Glucosio	1,0 g
Agar	15,0 g
Acqua	1000 ml

pH 6,5-6,6 (dopo sterilizzazione)

4.2. *Terreno base per il dosaggio* (*b*).

Triptone	10,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Estratto di carne	1,5 g
Glucosio	1,0 g
Agar	20,0 g
Tween 80	1 ml
Acqua	1000 ml

pH 6,5 (dopo sterilizzazione)

4.3. *Soluzione allo 0,8% (p/v) di cloruro di sodio.*

Sciogliere in acqua 8 g di cloruro di sodio p.a., portare a 1000 ml e sterilizzare.

4.4. *Miscela metanolo puro/acqua/acido cloridrico p.a.* (*d:* 1,18-1,19): 80/17,5/2,5 (v/v/v).

4.5. *Tampone fosfato, pH 6,5.*

Fosfato bipotassico K_2HPO_4 p.a.	22,15 g
Fosfato monopotassico KH_2PO_4 p.a.	27,85 g
Acqua, q.b. a	1000 ml

4.6. *Acido cloridrico p.a., d:* 1,18-1,19.

4.7. *Acido cloridrico p.a.* 0,1 *N.*

4.8. *Soluzione* 1 *N di idrossido di sodio p.a.*

4.9. *Soluzione allo* 0,04% (*p/v*) *di bromocresolporpora.*

Sciogliere 0,1 g di porpora di bromocresolo in 18,5 ml di soluzione 0,01 N di idrossido di sodio. Portare con acqua a 250 ml e omogenizzare.

4.10. *Sostanze di riferimento.*

Zinco-bacitracina ad attività nota (espressa in UI).

(*a*) Si possono impiegare altri metodi, purché sia dimostrato che essi diano una sospensione batterica simile.
(*b*) Si può utilizzare qualunque terreno colturale del commercio di composizione analoga purché dia gli stessi risultati.

5. Soluzioni di riferimento.

Pesare una quantità di zinco-bacitracina di riferimento (4.10.) corrispondente a 1050 UI (secondo il titolo indicato). Aggiungere 5 ml di acido cloridrico 0,1 N (4.7.) e lasciar riposare 15 minuti. Aggiungere 30 ml d'acqua, portare il pH a 4,5 con tampone fosfato pH 6,5 (4.5.), impiegandone 4 ml circa, portare con acqua a 50 ml ed omogenizzare (1 ml = 21 UI).

A partire da questa soluzione, preparare con diluizioni successive con il tampone fosfato pH 6,5 (4.5.) le seguenti soluzioni:

S_8 0,42 UI/ml
S_4 0,21 UI/ml
S_2 0,105 UI/ml
S_1 0,0525 UI/ml

6. Preparazione dell'estratto.

6.1. *Estrazione.*

6.1.1. Concentrati, premiscele (integratori) ed alimenti minerali.

Pesare una quantità di campione da 2,0 a 5,0 g, aggiungere 30 ml della miscela (4.4.) ed agitare brevemente. Verificare che il pH si aggiri intorno a 2. Agitare per 10 minuti, aggiungere 30 ml di tampone fosfato (4.5.) e agitare per 15 minuti. Diluire col tampone fosfato (4.5.) fino ad ottenere una concentrazione presunta in zinco-bacitracina pari a 0,42 UI/ml (= U_8).

6.1.2. Concentrati proteici.

Pesare una quantità di campione di 10,0 g, aggiungere 50 ml della miscela (4.4.) ed agitare brevemente. Verificare che il pH si aggiri intorno a 2. Agitare per 10 minuti, aggiungere 50 ml di tampone fosfato pH 6,5 (4.5.) ed agitare per 15 minuti. Diluire col tampone fosfato (4.5.) fino ad ottenere una concentrazione presunta in zinco-bacitracina pari a 0,42 UI/ml (= U_8).

6.1.3. Altri alimenti.

Pesare una quantità di campione di 10,0 g (20,0 g se si vuole ottenere una concentrazione presunta in zinco-bacitracina pari a 5 mg/kg), aggiungere 25 ml della miscela (4.4.) ed omogenizzare per 10 minuti circa. Aggiungere 25 ml di tampone fosfato pH 6,5 (4.5.), agitare per 15 minuti e centrifugare. Prelevare 20 ml del supernatante, portare il pH a 6,5 mediante la soluzione 1 N di idrossido di sodio (4.8.), adoperando come indicatore la soluzione di bromocresolporpora (4.9.). Evaporare fino al volume di 4 ml circa in un evaporatore rotante a temperatura non superiore a 35°C. Diluire il residuo con acqua fino ad ottenere una concentrazione presunta in zinco-bacitracina pari a 0,42 UI/ml (= U_8).

6.2. *Soluzioni dell'estratto.*

A partire dalla soluzione U_8, preparare con diluizioni successive (1 + 1) col tampone fosfato (4.5.) le soluzioni U_4 (concentrazione presunta: 0,21 UI/ml), U_2 (concentrazione presunta: 0,105 UI/ml) ed U_1 (concentrazione presunta: 0,0525 UI/ml).

7. Modalità di dosaggio.

7.1. *Inoculazione del terreno di coltura.*

Con la sospensione batterica (3.2.) insemenzare il terreno base per il dosaggio (4.2.), raffreddato a 50°C circa. Mediante saggi preliminari su piastra col terreno (4.2.) determinare la quantità di sospensione batterica che consente di ottenere per le differenti concentrazioni in zinco-bacitracina, aloni d'inibizione che abbiano la maggiore estensione possibile e che siano ancora netti.

7.2. *Preparazione delle piastre.*

La diffusione in agar si effettua su piastre, con le quattro concentrazioni della soluzione di riferimento (S_8, S_4, S_2, S_1) e le quattro concentrazioni dell'estratto (U_8, U_4, U_2, U_1). Ogni piastra deve necessariamente contenere le quattro concentrazioni della sostanza

di riferimento e dell'estratto. A tale scopo, impiegare piastre di dimensioni tali che possano contenere nel terreno agarizzato almeno 8 pozzetti del diametro di 10-13 mm, i cui centri non siano distanti fra loro meno di 30 mm.

Si possono adoperare come piastre delle lastre di vetro piane, provviste di un anello di alluminio o di materiale plastico del diametro di 200 mm e dell'altezza di 20 mm. Versare nelle piastre una quantità di terreno (4.2.), insemenzato come indicato al punto (7.1.), che permetta di ottenere uno strato dello spessore di 2 mm circa (50 ml per una piastra di 200 mm di diametro). Lasciar solidificare, praticare i pozzetti e deporvi dei volumi esattamente misurati delle soluzioni della sostanza di riferimento e dell'estratto (da 0,10 a 0,15 ml per pozzetto a seconda del diametro).

Le operazioni descritte vanno ripetute almeno quattro volte per ogni concentrazione, in modo da ottenere per ciascuna determinazione 32 aloni di inibizione.

7.3. *Incubazione.*

Incubare le piastre per 16-18 ore alla temperatura di 30°C circa.

8. VALUTAZIONE.

Misurare il diametro degli aloni di inibizione con l'approssimazione di 0,1 mm. Per ogni concentrazione, registrare le misure medie su carta semilogaritmica, riportando il logaritmo delle concentrazioni in funzione del diametro dell'alone di inibizione. Tracciare le rette più appropriate per la soluzione di riferimento e per estratto, procedendo ad esempio come segue:

Determinare il punto più appropriato per il livello più basso della soluzione di riferimento (SL) mediante la formula:

$$(a)\ SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Determinare il punto più appropriato per il livello più elevato della soluzione di riferimento (SH) mediante la formula:

$$(b)\ SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Determinare allo stesso modo i punti più appropriati per l'estratto al livello più basso (UL) ed al livello più alto (UH) sostituendo nelle formule sopra riportate i valori di s_1, s_2, s_4 e s_8 con quelli di u_1, u_2, u_4 ed u_8. Riportare i valori di SL ed SH sullo stesso grafico. Congiungendo i due punti si ottiene la retta più appropriata per la soluzione standard. Procedendo allo stesso modo per UL ed UH si ottiene la retta più appropriata per l'estratto.

In mancanza di interferenze le rette dovrebbero essere parallele. In pratica, esse sono considerate parallele allorché (SH-SL) ed (UH-UL) non differiscono fra loro di più del 10% della loro media.

Se le rette non sono parallele, è possibile eliminare sia u_1 ed s_1, sia u_8 ed s_8. I valori SL, SH, UL ed UH che permettono di ottenere le rette più appropriate vanno calcolati mediante le formule seguenti:

$$(a')\ SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \text{ o } \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b')\ SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \text{ o } \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

e mediante formule analoghe per UL ed UH. Se si utilizza questa alternativa, bisogna verificare il parallelismo delle rette nel modo sopra descritto. Se il risultato è stato ottenuto a partire da tre punti, ciò va indicato sul certificato di analisi.

Quando le rette sono considerate parallele, calcolare il logaritmo dell'attività relativa (log A) con una delle formule seguenti:

Per 4 punti:

$$(c)\ \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Per 3 punti:

$$(d)\ \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0{,}401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

oppure

$$(d')\ \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Attività reale = attività presunta × attività relativa.

Allorché le rette non sono considerate parallele, ripetere la determinazione.

Se in base a questa nuova determinazione non è ancora possibile ottenere il parallelismo, calcolare il logaritmo dell'attività relativa (log A) mediante la formula (c). Il risultato ottenuto dovrà tuttavia essere considerato come approssimativo: ciò dovrà risultare dal certificato di analisi.

9. RIPETIBILITÀ.

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non dovrebbe eccedere:

il 20% del risultato più elevato per i tenori in zinco-bacitracina compresi fra 5 e 25 mg/kg;

5 mg/kg, in valore assoluto, per i tenori superiori a 25 mg/kg e fino a 50 mg/kg;

il 10% del risultato più elevato per i tenori superiori a 50 mg/kg.

2. — DOSAGGIO DEL FLAVOFOSFOLIPOL

— per diffusione in agar —

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Il metodo permette di dosare il flavofosfolipol nei mangimi, nei concentrati e nelle premiscele. Il limite inferiore di dosaggio è di 1 mg/kg (1 ppm).

2. PRINCIPIO.

Il campione viene estratto con metanolo diluito mediante riscaldamento a riflusso. L'estratto viene centrifugato, purificato, se necessario su resine a scambio ionico e diluito. La sua attività antibiotica è determinata misurando la diffusione del flavofosfolipol in terreno agarizzato, insemenzato con lo *Staphylococcus aureus*. La diffusione è rivelata dalla formazione di aloni di inibizione del microorganismo. Si ammette che il diametro di tali aloni sia direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione di antibiotico.

3. MICRORGANISMO: STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 6538 P.

3.1. *Conservazione del ceppo.*

Insemenzare con lo *Staphylococcus aureus* il terreno colturale (4.1.), distribuito in provette a becco di clarino. Incubare 24 ore a 37°C, conservare a + 4°C e trapiantare ogni mese.

3.2. *Preparazione della sospensione batterica* (a).

Prelevare due provette contenenti la coltura-madre (3.1.) e trapiantare tutte le settimane. Incubare per 24 ore a 37°C e conservare a + 4°C circa.

24 ore prima del dosaggio, insemenzare con una di queste colture da due a quattro provette con il terreno di coltura (4.1.), distribuito a becco di clarino. Incubare da 16 a 18 ore a 37°C. Sospendere la patina in soluzione di cloruro di sodio (4.3.). La trasmittanza della sospensione, misurata a 578 nm sotto uno spessore di 1 cm, dev'essere del 40% circa rispetto a quella della soluzione di cloruro di sodio.

(a) Si possono impiegare altri metodi, purché sia dimostrato che essi diano una sospensione batterica simile.

4. TERRENI COLTURALI E REATTIVI.

4.1. *Terreno di mantenimento del ceppo* (*a*).

Peptone di carne	6,0 g
Triptone	4,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Estratto di carne	1,5 g
Glucosio	1,0 g
Agar	15,0 g
Acqua	1000 ml

pH 6,5 (dopo sterilizzazione)

4.2. *Terreno base per il dosaggio.*

4.2.1. Strato inferiore (*b*).

Peptone di carne	6,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Estratto di carne	1,5 g
Agar	10,0 g
Acqua	1000 ml

pH 6,5 (dopo sterilizzazione)

4.2.2. Strato da insemenzare.

Terreno (4.1.), addizionato di 2,0 g di emulsione antischiuma al silicone (*c*).

4.3. *Soluzione allo 0,4% (p/v) di cloruro di sodio.*

Disciogliere in acqua 4 g di cloruro di sodio p.a. Portare a 1000 ml e sterilizzare.

4.4. *Metanolo puro.*

4.5. *Metanolo al 50% (v/v).*

Diluire 500 ml di metanolo (4.4.) con 500 ml di acqua.

4.6. *Metanolo all'80% (v/v).*

Diluire 800 ml di metanolo (4.4.) con 200 ml d'acqua.

4.7. *Tris (idrossimetil) aminometano p.a.*

4.8. *Soluzione metanolica all'1,5% (p/v) di cloruro di potassio.*

Sciogliere 1,5 g di cloruro di potassio p.a. in 20 ml d'acqua e portare a 100 ml con metanolo (4.4.).

4.9. *Scambiatore di cationi.*

Dowex 50 WX8, 20-50 mesh, forma Na (cat. Serva n. 41600) o equivalente.

4.10. *Scambiatore di anioni.*

Dowex 1X2, 50-100 mesh, forma Cl (cat. Serva n. 41010) o equivalente. Prima dell'impiego, immergere per 12-14 ore il prodotto in metanolo all'80% (4.6.).

4.11. *Lana di vetro.*

4.12. *Cartine indicatrici del pH (pH 6,6-8,1).*

4.13. *Acido ascorbico.*

4.14. *Sostanza di riferimento.*

Flavofosfolipol ad attività nota.

(*a*) Si può utilizzare qualunque terreno colturale del commercio di analoga composizione che dia gli stessi risultati, come ad esempio Oxoid Antibiotic Medium 1 (CM 327), addizionato di agar Oxoid N. 3 (L 13).

(*b*) Si può utilizzare qualunque terreno colturale del commercio di analoga composizione che dia gli stessi risultati come ad esempio Oxoid Antibiotic Medium 2 (CM 335), addizionato di agar Oxoid N. 3 (L 13).

(*c*) Per esempio SE 2, della Wacker Chemie GmbH. Monaco.

5. APPARECCHIATURA.

5.1. *Colonna in vetro per cromatografia, del diametro interno di 9 mm e della lunghezza di 150-200 mm, munita di un rubinetto nell'estremità inferiore e di un giunto normalizzato* (per il collegamento dell'imbuto 5.2.) *all'estremità superiore.*

5.2. *Imbuto di carico da 250 ml, provvisto di rubinetto e smerigliatura normalizzata.*

5.3. *Beuta da 250 ml, a smerigliatura normalizzata.*

5.4. *Refrigerante a ricadere, a smerigliatura normalizzata.*

6. SOLUZIONI DI RIFERIMENTO.

Sciogliere una quantità esattamente pesata di sostanza di riferimento (4.14.) in metanolo al 50% (4.5.) e diluire in modo da ottenere una soluzione madre di flavofosfolipol contenente 100 µg/ml. Conservata in bottiglia chiusa e alla temperatura di 4°C, la soluzione si mantiene stabile per due mesi.

A partire da questa soluzione, preparare con diluizioni successive con metanolo al 50% (4.5.) le seguenti soluzioni:

S_8 0,2 µg/ml;
S_4 0,1 µg/ml;
S_2 0,05 µg/ml;
S_1 0,025 µg/ml.

7. PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO.

7.1. *Estrazione.*

7.1.1. Concentrati, premiscele (integratori) ed alimenti minerali.

Pesare una quantità di campione dell'ordine di 2,0-5,0 g; addizionare 150 mg circa di acido ascorbico (4.13.). Omogeneizzare con 150 ml di metanolo al 50% (4.5.) in una beuta (5.3.) e portare il pH a 8,1-8,2 aggiungendo 400 mg circa di tris (idrossimetil) aminometano (4.7.). Verificare il pH con le cartine indicatrici (4.12.). Lasciar riposare per 15 minuti, portare di nuovo il pH a 8,1-8,2 con ulteriore aggiunta di tris (idrossimetil) aminometano (4.7.), poi far bollire per 10 minuti a riflusso (5.4.), agitando continuamente. Lasciar raffreddare, poi centrifugare e decantare l'estratto.

7.1.2. Altri alimenti.

Pesare una quantità di campione dell'ordine di 5,0-30,0 g, contenente almeno 30 µg di flavofosfolipol. Omogeneizzare con 150 ml di metanolo al 50% (4.5.) in una beuta (5.3.) e portare il pH a 8,1-8,2 aggiungendo 400 mg circa di tris (idrossimetil) aminometano (4.7.). Controllare il pH con le cartine indicatrici (4.12.). Lasciar riposare per 15 minuti, portare di nuovo il pH a 8,1-8,2 per ulteriore aggiunta di tris (idrossimetil) aminometano (4.7.) e far poi bollire per 10 minuti a riflusso (5.4.), agitando continuamente. Lasciar raffreddare, poi centrifugare e decantare l'estratto.

7.2. *Purificazione (questo procedimento può essere omesso per i concentrati, le premiscele - integratori - e per gli alimenti minerali).*

Miscelare 110 ml dell'estratto con 11 g dello scambiatore di cationi (4.9.); far bollire per un minuto a riflusso (5.4.) agitando continuamente. Separare la resina a scambio cationico per centrifugazione o filtrazione. Miscelare 100 ml dell'estratto con 150 ml di metanolo (4.4.) e lasciar riposare la soluzione da 12 a 15 ore a 4°C. Eliminare il materiale flocculato per filtrazione a freddo.

Introdurre un tampone di lana di vetro (4.11.) nell'estremità inferiore della colonna (5.1.), versare nella stessa 5 ml di resina a scambio anionico (4.10.) e lavarlo con 100 ml di metanolo all'80% (4.6.). Mediante l'imbuto (5.2.) travasare poi nella colonna un volume di filtrato, pari ad almeno 100 ml, che contenga presumibilmente 16 µg di flavofosfolipol (200 ml per un campione di 30 g di alimento contenente 1 ppm). Prima di travasare il filtrato nella colonna, diluirlo se necessario con metanolo all'80% (4.6.) in modo da ottenere una concentrazione presunta di flavofosfolipol pari a

16 µg in 100 ml. Fare in modo che il liquido defluisca a una velocità di 2 ml circa al minuto. Eliminare tutto il filtrato. Lavare poi la colonna con 50 ml di metanolo all'80% (4.6.) ed eliminare il filtrato.

Eluire il flavofosfolipol con la soluzione metanolica di cloruro di potassio (4.8.), mantenendo la velocità di deflusso sui 2 ml al minuto. Raccogliere 50 ml di eluato in un recipiente graduato, aggiungere 30 ml d'acqua ed omogeneizzare. Il tenore in flavofosfolipol di questa soluzione dovrebbe essere di 0,2 µg/ml ($=U_8$).

7.3. *Soluzioni dell'estratto.*

Se necessario (particolarmente nei casi in cui è stata omessa la purificazione), diluire l'estratto ottenuto secondo (7.1.1.) con metanolo al 50% (4.5.), in modo da ottenere una concentrazione presunta in flavofosfolipol pari a 0,2 g/ml ($=U_8$).

Partendo dalla soluzione U_8, preparare con diluizioni successive (1 : 1) con metanolo al 50% (4.5.) le soluzioni U_4 (concentrazione presunta: 0,1 µg/ml), U_2 (concentrazione presunta: 0,05 µg/ml) ed U_1 (concentrazione presunta: 0,025 µg/mlg).

8. MODALITÀ DI DOSAGGIO.

8.1. *Inoculazione del terreno di coltura.*

Con la sospensione batterica (3.2.) insemenzare a 50°C circa il terreno di base del dosaggio (4.2.2.). Mediante saggi preliminari su piastra col terreno (4.2.2.), determinare la quantità di sospensione batterica che consente di ottenere, per le differenti concentrazioni di flavofosfolipol, zone di inibizione che abbiano la maggiore estensione possibile e che siano ancora nette (circa 30 ml per litro).

8.2. *Preparazione delle piastre.*

La diffusione in agar si effettua su piastre, con le quattro concentrazioni della soluzione di riferimento (S_8, S_4, S_2, S_1) e le quattro concentrazioni dell'estratto (U_8, U_4, U_2, U_1). Ogni piastra deve necessariamente contenere le quattro concentrazioni delle sostanze di riferimento e dell'estratto. A tale scopo, impiegare piastre di dimensioni tali che possano contenere nel terreno agarizzato almeno 8 pozzetti del diametro di 10-13 mm, i cui centri non siano distanti fra loro meno di 30 mm. Si possono utilizzare come piastre delle lastre di vetro piane, provviste di un anello di alluminio o di materia plastica del diametro di 200 mm e dell'atezza di 20 mm.

Versare nelle piastre una quantità del terreno (4.2.1.) che permetta di ottenere uno strato dello spessore di 1,5 mm circa (45 ml per una piastra da 200 mm di diametro). Lasciar solidificare ed aggiungere una quantità di terreno (4.2.2.), insemenzata come indicato ad 8.1., che permetta di ottenere uno strato dello spessore di 1 mm (30 ml per una scatola da 200 mm di diametro). Lasciar solidificare, praticare i pozzetti e deporvi dei volumi esattamente misurati della soluzione di riferimento e dell'estratto (da 0,10 a 0,15 ml per pozzetto a seconda del diametro).

Le operazioni descritte vanno ripetute almeno quattro volte per ogni concentrazione, in modo da ottenere per ciascuna determinazione 32 aloni di inibizione.

8.3. *Incubazione.*

Incubare le piastre per 16-18 ore alla temperatura di 28-30°C.

9. VALUTAZIONE.

Misurare il diametro delle zone di inibizione con l'approssimazione di 0,1 mm. Per ogni concentrazione, registrare le misure medie su carta semilogaritmica, riportando il logaritmo delle concentrazioni in funzione del diametro delle zone di inibizione. Tracciare le rette più appropriate per la soluzione di riferimento e per l'estratto, procedendo ad esempio come segue:

Determinare il punto più appropriato per il livello più basso della soluzione di riferimento (SL) mediante la formula:

$$(a)\quad SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Determinare il punto più appropriato per il livello più elevato della soluzione di riferimento (SH) mediante la formula:

$$(b)\quad SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Determinare allo stesso modo i punti più appropriati per l'estratto al livello più basso (UL) ed al livello più alto (UH), sostituendo nelle formule sopra riportate i valori di s_1, s_2, s_4 ed s_8 con quelli di u_1, u_2, u_4 ed u_8.

Riportare i valori di SL ed SH sullo stesso grafico. Congiungendo i due punti si ottiene la retta più appropriata per la soluzione standard. Procedendo allo stesso modo per UL ed UH si ottiene la retta più appropriata per l'estratto.

In mancanza di interferenze le rette dovrebbero essere parallele. In pratica, esse sono considerate parallele allorché (SH-SL) ed (UH-UL) non differiscono più del 10% della loro media.

Se le rette non sono parallele, è possibile eliminare sia u_1 ed s_1, sia u_8 ed s_8. I valori SL, SH, UL ed UH che permettono di ottenere le rette più appropriate vanno allora calcolati mediante le formule seguenti:

$$(a')\quad SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \text{ o } \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b')\quad SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \text{ o } \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

e mediante formule analoghe per UL ed UH. Se si utilizza questa alternativa, bisogna verificare il parallelismo delle rette nel modo sopra descritto. Se il risultato è stato ottenuto a partire da tre punti, ciò va indicato nel certificato di analisi.

Quando le rette sono considerate parallele, calcolare il logaritmo dell'attività relativa (log A) con una delle formule seguenti:

Per 4 punti:

$$(c)\quad \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Per 3 punti:

$$(d)\quad \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0{,}401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

oppure

$$(d')\quad \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Attività reale = attività presunta × attività relativa.

Allorché le rette non sono considerate parallele, ripetere la determinazione.

Se in base a questa nuova determinazione non è ancora possibile ottenere il parallelismo, calcolare il logaritmo dell'attività relativa (log A) mediante la formula (c). Il risultato ottenuto dovrà tuttavia essere considerato approssimativo: ciò dovrà risultare dal certificato di analisi.

10. RIPETIBILITÀ.

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non dovrebbe eccedere:

0,5 mg/kg, in valore assoluto, per i tenori in flavofosfolipol da 1 a 2 mg/kg;

il 25% del risultato più elevato per i tenori superiori a 2 mg/kg e fino a 10 mg/kg;

il 20% del risultato più elevato per i tenori superiori a 10 mg/kg e fino a 25 mg/kg;

5 mg/kg, in valore assoluto, per i tenori superiori a 25 mg/kg e fino a 50 mg/kg;

il 10% del risultato più elevato per i tenori superiori a 50 mg/kg.

3. — DETERMINAZIONE DEGLI OLIGO ELEMENTI FERRO, RAME, MANGANESE E ZINCO

1. Oggetto e campo d'applicazione.

Il presente metodo permette di determinare gli oligo elementi ferro, rame, manganese e zinco contenuti negli alimenti per animali. I limiti inferiori di determinazione sono i seguenti:

ferro (Fe): . . . 20 mg/kg;
rame (Cu): . . . 10 mg/kg;
manganese (Mn): 20 mg/kg;
zinco (Zn): . . . 20 mg/kg.

2. Principio.

Il campione viene disciolto in acido cloridrico dopo distruzione delle sostanze organiche eventualmente presenti. La determinazione del ferro, del rame, del manganese e dello zinco viene effettuata, dopo opportuna diluizione, mediante spettrometria di assorbimento atomico.

3. Reattivi.

Osservazioni preliminari.

Per la preparazione dei reattivi e delle soluzioni analitiche va impiegata acqua esente dai cationi da determinare, preparata o per doppia distillazione dell'acqua su vetro al borosilicato o di quarzo o per doppio passaggio su resine a scambio ionico.

I reattivi debbono essere di purezza almeno «analitica» (p.a.). L'assenza dell'elemento da determinare deve essere controllata mediante una prova in bianco.

Se necessario, i reattivi dovranno essere ulteriormente purificati.

In luogo delle soluzioni standard appresso elencate è possibile impiegare soluzioni standard del commercio, purché fornite di garanzia e controllate prima dell'uso.

3.1. *Acido cloridrico p.a., d = 1,19.*

3.2. *Acido cloridrico p.a., 6 N.*

3.3. *Acido cloridrico p.a., 0,5 N.*

3.4. *Acido fluoridrico al 38-40% (v/v), con un contenuto in ferro inferiore ad 1 mg Fe/l ed un residuo all'evaporazione* (espresso in solfati) *inferiore a 10 mg/l.*

3.5. *Acido solforico p.a., d = 1,84.*

3.6. *Acqua ossigenata p.a., a 100 volumi circa di ossigeno (30% in peso).*

3.7. *Soluzione standard di ferro (1000 μg Fe/ml).*

Sciogliere 1 g di fil di ferro p.a. in 200 ml di acido cloridrico 6 N (3.2.), aggiungere 16 ml di acqua ossigenata (3.6.) e portare ad un litro con acqua.

3.7.1. Soluzione standard diluita (100 μg Fe/ml).

Diluire un volume della soluzione standard (3.7.) con 9 volumi d'acqua.

3.8. *Soluzione standard di rame (1000 μg Cu/ml).*

Sciogliere 1 g di rame in polvere (p.a.) in 25 ml di acido cloridrico 6 N (3.2.), aggiungere 5 ml di acqua ossigenata (3.6.) e portare ad 1 litro con acqua.

3.8.1. Soluzione standard diluita (10 μg Cu/ml).

Diluire 1 volume della soluzione standard (3.8.) con 9 volumi d'acqua, poi ridiluire 1 volume della soluzione ottenuta con 9 volumi d'acqua.

3.9. *Soluzione standard di manganese (1000 μg Mn/ml).*

Sciogliere 1 g di manganese in polvere (p.a.) in 25 ml di acido cloridrico 6 N (3.2.) a portare ad 1 litro con acqua.

3.9.1. Soluzione standard diluita (10 μg Mn/ml).

Diluire 1 volume della soluzione standard (3.9.) con 9 volumi d'acqua, poi ridiluire 1 volume della soluzione ottenuta con 9 volumi d'acqua.

3.10. *Soluzione standard di zinco (1000 μg Zn/ml).*

Sciogliere 1 g di zinco in lamine o in fogli (p.a.) in 25 ml di acido cloridrico 6 N (3.2.) e portare ad 1 litro con acqua.

3.10.1. Soluzione standard diluita (10 μg Zn/ml).

Diluire 1 volume della soluzione standard (3.10.) con 9 volumi d'acqua, poi ridiluire 1 volume della soluzione ottenuta con 9 volumi d'acqua.

3.11. *Soluzione di cloruro di lantanio.*

Sciogliere 12 g di ossido di lantanio in 150 ml d'acqua, aggiungere 100 ml di acido cloridrico 6 N (3.2.) e portare ad 1 litro con acqua.

4. Apparecchiatura.

4.1. *Muffola a temperatura regolabile e controllata.*

4.2. ***Vetreria resistente in borosilicato; si raccomanda di riservarla esclusivamente alla determinazione degli oligo elementi.***

4.3. *Capsula di platino e crogiuolo di quarzo (quest'ultimo facoltativo).*

4.4. ***Spettrofotometro di assorbimento atomico, corrispondente alle esigenze del metodo per quanto riguarda la sensibilità e la precisione nell'intervallo delle misurazioni richieste.***

5. Modo di operare.

5.1. *Campioni contenenti sostanze organiche.*

5.1.1. Incenerimento e preparazione della soluzione da analizzare (*).

(i) Porre 5-10 g di campione, pesato con l'approssimazione di 0,2 mg, in una capsula di quarzo o di platino (4.3.) (v. nota *b*), essiccare in stufa a 105°C ed introdurre la capsula nella muffola fredda (4.1.). Chiudere la muffola (v. nota *c*) ed elevarne gradualmente la temperatura in modo da raggiungere 450-475°C in 90 minuti circa. Mantenere questa temperatura durante 4-16 ore (per esempio durante la notte) in modo da eliminare la materia carboniosa, poi aprire la muffola e lasciar raffreddare (v. nota *d*).

(*) Nel foraggio verde (fresco od essiccato) possono essere presenti notevoli quantità di silice vegetale, che è capace di trattenere gli oligo elementi e che va quindi eliminata. Ai campioni di tali prodotti va pertanto applicato il procedimento seguente:

eseguire le operazioni descritte al punto 5.1.1.(i), fino alla filtrazione. Lavare per due volte con acqua bollente la carta da filtro contenente il residuo insolubile e porla in una capsula di platino (4.3.). Calcinare in muffola (4.1.) a temperatura inferiore ai 550°C, fino a scomparsa completa delle sostanze carboniose. Lasciar raffreddare, aggiungere qualche goccia d'acqua, poi 10-15 ml di acido fluoridrico (3.4.), quindi portare a secchezza a 150°C circa. Se nel residuo rimane ancora della silice, ridiscioglierla in pochi ml di acido fluoridrico (3.4.) e portare a secchezza. Aggiungere 5 gocce di acido solforico (3.5.) e riscaldare fino a scomparsa dei fumi bianchi. Addizionare 5 ml di acido cloridrico 6 N (3.2.) e 30 ml circa d'acqua; riscaldare, filtrare la soluzione in un matraccio tarato da 250 ml e portare a volume con acqua (concentrazione dell'acido cloridrico: 0,5 N circa). A questo punto, proseguire la determinazione a partire dal punto 5.1.3.

Inumidire le ceneri con acqua e trasferirle in un becher da 250 ml. Lavare bene la capsula con un totale di circa 5 ml di acido cloridrico (3.1.) e travasare lentamente ed accuratamente quest'ultimo nel becher (si può avere un'energica reazione, per sviluppo di CO_2). Aggiungere goccia a goccia acido cloridrico (3.1.), agitando finché l'effervescenza sia terminata. Evaporare a secchezza agitando ogni tanto con una bacchetta di vetro.

Aggiungere al residuo 15 ml di acido cloridrico 6 N (3.2.), seguiti da circa 120 ml d'acqua. Rimescolare con la bacchetta di vetro, che va lasciata nel becher, e coprire con un vetro da orologio. Portare la soluzione a leggera ebollizione e mantenerla finché non si noti ulteriore dissoluzione delle ceneri. Filtrare su carta priva di ceneri e raccogliere il filtrato in un matraccio tarato da 250 ml. Lavare il becher ed il filtro prima con 5 ml di acido cloridrico 6 N caldo (3.2.), poi, per due volte, con acqua bollente. Portare a volume con acqua (concentrazione dell'acido cloridrico: 0,5 N).

(ii) Se il residuo nel filtro è nero (presenza di carbone), rimetterlo nella muffola ed incenerire di nuovo a 450-475°C. Questo incenerimento, che richiede solo alcune ore (da 3 a 5 ore), è completo allorché le ceneri appaiono bianche o quasi. Sciogliere di nuovo il residuo con circa 2 ml di acido cloridrico (3.1.), evaporare a secchezza ed aggiungere 5 ml di acido cloridrico 6 N (3.2.). Riscaldare la soluzione e filtrarla nel matraccio tarato e portare a volume con acqua (concentrazione dell'acido cloridrico: 0,5 N circa).

Note

(*a*) Nella determinazione degli oligo elementi è importante ovviare ai rischi di contaminazione, in particolare quella da zinco, rame e ferro. L'attrezzatura impiegata nella preparazione dei campioni deve quindi essere esente da tali metalli.

Per ridurre i rischi generali di contaminazione, lavorare in ambiente esente da polvere con apparecchiature scrupolosamente pulite e vetreria accuratamente lavata. La determinazione dello zinco è particolarmente sensibile a molti tipi di contaminazione, per esempio quella dovuta alla vetreria, ai reattivi, alla polvere, ecc.

(*b*) La pesata del campione da incenerire va calcolato in funzione del contenuto approssimativo in oligo elementi del mangime in esame e della sensibilità dello spettrofotometro adoperato. Per taluni alimenti per animali a basso tenore di oligo elementi può essere necessario partire da un campione del peso di 10-20 g e limitare a soli 100 ml il volume della soluzione finale.

(*c*) L'incenerimento deve essere effettuato in muffola chiusa, senza insufflazione d'aria o di ossigeno.

(*d*) La temperatura indicata dal pirometro non deve superare i 475°C.

5.1.2. Determinazione spettrofotometrica.

5.1.2.1. Preparazione delle soluzioni per la curva di taratura.

Per ciascun oligo elemento da dosare, preparare una serie di soluzioni di taratura a partire dalle soluzioni stardard diluite 3.7.1., 3.8.1., 3.9.1. e 3.10.1., in modo che la concentrazione dell'acido cloridrico in ciascuna di esse sia all'incirca 0,5 N, e, nel caso del ferro, del manganese e dello zinco, la concentrazione del cloruro di lantanio corrisponda allo 0,1% di La (v/v). Le concentrazioni prescelte per gli oligo elementi debbono trovarsi nell'intervallo di sensibilità dello spettrofotometro utilizzato. Le tabelle seguenti riportano a titolo di esempio, alcuni tipi di composizione delle soluzioni di taratura; nondimeno a seconda del tipo e della sensibilità dello spettrofotometro impiegato potrà essere necessario scegliere altre concentrazioni.

FERRO

μg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml di soluzione standard diluita (3.7.1.) (1 ml = 100 μg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
+ ml HCl 6 N (3.2.)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11.); portare a 100 ml con H_2O.

RAME

μg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml di soluzione standard diluita (3.8.1.) (1 ml = 10 μg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml HCl 6 N (3.2.)	8	8	8	8	8	8	8

portare a 1000 ml con acqua.

MANGANESE

μg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml di soluzione standard diluita (3.9.1.) (1 ml = 10 μg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml HCl 6 N (3.2.)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11.); portare a 100 ml con acqua.

ZINCO

μg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml di soluzione standard diluita (3.10.1.) (1 ml = 10 μg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
+ ml HCl 6 N (3.2.)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11.); portare a 100 ml con acqua.

5.1.2.2. Preparazione della soluzione da analizzare.

Per il dosaggio del rame, la soluzione preparata secondo quanto indicato al punto 5.1.1. può in linea generale essere utilizzata direttamente. Se è necessario portare la sua concentrazione nell'intervallo di quelle delle soluzioni di taratura, un'aliquota di essa può essere prelevata e portata a volume in un pallone tarato da 100 ml con acido cloridrico 0,5 N (3.3.).

Per il dosaggio del ferro, del manganese e dello zinco, pipettare un'aliquota della soluzione adoperata secondo 5.1.1. in un pallone tarato da 100 ml; aggiungere 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11.) e portare a volume con acido cloridrico 0,5 N (3.3.) (v. anche punto 8, « osservazione »).

5.1.2.3. Prova in bianco.

Effettuare una prova in bianco comprendente tutte le operazioni prescritte nel procedimento, escludendo la sola presenza del campione. La soluzione di taratura « 0 » non deve essere utilizzata come « bianco ».

5.1.2.4. Misurazione dell'assorbimento atomico.

Misurare l'assorbimento delle soluzioni di taratura e della soluzione da analizzare, impiegando una fiamma ossidante aria-acetilene, alle lunghezze d'onda seguenti:

Fe: . . . 248,3 nm;
Cu: . . . 324,8 nm;
Mn: . . . 279,5 nm;
Zn: . . . 213,8 nm.

Ripetere ogni misurazione quattro volte.

5.2. *Mangimi minerali.*

In assenza di materiali organici, l'incenerimento preliminare è superfluo.

Operare come descritto al punto 5.1.1.(i), a partire dal secondo paragrafo.

L'evaporazione in presenza di acido fluoridrico può essere tralasciata.

6. CALCOLO DEI RISULTATI.

Dalla curva di taratura, calcolare la concentrazione degli oligo elementi nella soluzione in esame ed esprimere il risultato in mg di oligo elemento per kg di campione (ppm).

7. RIPETIBILITÀ.

La differenza fra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non dovrebbe eccedere:

5 mg/kg, in valore assoluto, per i tenori in oligo elementi fino a 50 mg/kg;

il 10% del risultato più elevato per i tenori superiori a 50 e fino a 100 mg/kg;

10 mg/kg, in valore assoluto, per i tenori superiori a 100 e fino a 200 mg/kg;

il 5% del risultato più elevato per i tenori superiori a 200 mg/kg.

8. OSSERVAZIONE.

La presenza di elevate quantità di fosfati può interferire nel dosaggio del ferro, del manganese e dello zinco. Si può ovviare a questa interferenza aggiungendo opportune quantità di soluzione di cloruro di lantanio (3.11.). Se tuttavia nel campione il rapporto ponderale è $\frac{Ca + Mg}{P} > 2$, si può tralasciare l'aggiunta di soluzione di cloruro di lantanio sia alla soluzione in esame che alle soluzioni di taratura.

Il Ministro dell'agricoltura e delle foreste
MARCORA

(7883)

ANTONIO SESSA, *direttore* DINO EGIDIO MARTINA, *redattore*

(9651140/2) Roma - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - S.